

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAISO – CHILE



**“Evaluación de la eficiencia de remoción de pesticidas en ceras de abeja
utilizando métodos de purificación con soluciones hidroalcohólicas y
posterior caracterización físico/química”**

Francisco Osses Espinosa

Memoria de titulación para optar al título de
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

Profesor Guía: Daniel Ramírez

Profesores Correferentes: Karen Yáñez

RESUMEN EJECUTIVO

Los polinizadores, principalmente las abejas, desempeñan un papel crucial al visitar más del 80% de los cultivos, visitando más del 80% de ellos (Potts et al., 2016). Sin embargo, enfrentan amenazas como enfermedades, polución, pesticidas, y prácticas agrícolas industriales, lo que afecta tanto a su supervivencia como a los productos apícolas (Nick A. Romero, 2022).

El objetivo de este estudio es proponer una nueva metodología de purificación de ceras de abeja con mayor eficiencia en la remoción de acaricidas en base a una solución hidroalcohólicas,

En la primera etapa del estudio, se contaminaron cuatro muestras de cera (300 [g] cada una) con 1000 [ppb] de cuatro pesticidas: coumaphos, amitraz, fluvalinato e imidacloprid. Posteriormente, se sometieron a tres métodos de purificación: M1 (etanol y agua 50:50 v/v), M2 (isopropanol y agua 50:50 v/v) y M3 (1-butanol, 2-butanol y agua 25:25:50 v/v). Cada método utilizó una relación de 1:4 [kg cera/solución], a 80 [°C] y 500 [rpm] durante 10 minutos. Los resultados del estudio mostraron que el método M1 logró una remoción del 95% de imidacloprid, 3,8% de fluvalinato y 10,8% de coumaphos; M2 alcanzó 95%, 28% y 38%, respectivamente; y M3 obtuvo 95%, 44% y 4%. El amitraz no se detectó en las muestras analizadas (M1, M2, M3, control), se sostiene la hipótesis de que puede haberse degradado en sus metabolitos, por lo tanto, lo que se sugiere considerar para futuros estudios sus metabolitos.

Tras la purificación, los análisis de calidad indicaron que las ceras conservaron parámetros aceptables en relación con el punto de fusión. No obstante, M3 mostró diferencias significativas en los espectros de espectroscopía infrarroja, mientras que M2 y M1 lograron preservar las señales características de la cera de abeja.

En índices de caracterización, el índice de acidez se mantuvo dentro del rango de referencia, pero los índices de saponificación y esterificación se encontraron fuera del rango establecido por la European Pharmacopoeia (2008), lo que podría deberse a alteraciones inducidas por las soluciones limpiantes o errores experimentales.

En general, la mezcla agua-isopropanol 50:50 v/v (M2) se destacó como el mejor método de purificación por su balance entre eficiencia de remoción de pesticidas y preservación de la calidad de la cera.

INDICE

Contenido

1.INTRODUCCION	5
2.OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivos específicos	6
3.ANTECEDENTES GENERALES.....	6
3.1) Descripción de las abejas	6
3.2) Productos de la Colmena.....	8
3.3) Pesticidas en abejas.....	9
3.4) Efecto sobre las abejas.....	10
3.4.1) Neonicotinoides	10
3.4.2) Acaricidas.....	11
3.4.3) Plaguicidas objeto de estudios	11
3.5) Situación actual sobre la apicultura en Chile.....	13
3.5.1) Universo de apicultores.....	13
3.5.2) exportación de miel y otros productos apícolas	14
4.METODOS ANALÍTICOS PARA MATRIZ DE CERA.....	15
4.1 Preparación de muestra	15
4.2 Técnicas analíticas	16
4.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	17
4.3 Espectrometría de Masas	18
5.METODOLOGIA.....	18
5.1 Materiales	19
5.1.1 Contaminación de ceras	19
5.1.2) Purificación de ceras.....	19
5.1.3) Optimización de parámetros químicos UHPLC-MS/MS	19
Reactivo	20

Equipo	20
5.1.4) Índice de acidez e Índice de saponificación	20
5.1.5) Temperatura de fusión	20
5.1.6) espectroscopia de fuerzas.....	21
5.1.7) análisis de humedad.....	21
5.1.8) Método de extracción por.....	21
5.2) Experimentación	22
5.2.1) Contaminación de cera.....	22
5.2.1) Purificación de ceras.....	22
5.2.3) Análisis Físico/Químico.....	24
5.2.3.5) Optimización de parámetros químicos	27
5.2.3.6) Procedimiento Curvas de Calibrado	28
5.2.3.5) MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR QuEChERS	28
6.RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
6.1) Curva de calibrado	29
6.2) Purificación de ceras.....	31
6.3) Análisis físico/ químico.....	33
8.3.1) índices de caracterización	33
6.3.2) espectroscopía de fuerzas.....	35
6.2.3) Temperatura de Fusión.....	35
6.3.4) espectroscopía Infrarroja	36
6.3.5) Análisis porcentaje de humedad	38
8.CONCLUSIÓN	39
9.REFERENCIAS.....	40
10.ANEXO.....	44
10.1) Anexo 2: Propiedades físico-químicas de pesticidas de estudio (solubilidad en agua, peso molecular y pow)	44
10.2) Anexo 2: Asignación de modos vibracionales de cera de abeja.....	45

1.INTRODUCCION

Las abejas han sido declaradas los seres vivos más importantes del planeta tierra, según instituto EarthWatch, esto se debe principalmente a su papel en la polinización que es esencial para la reproducción de muchas plantas y, por ende, para la producción de alimento. (Zone, 2019)

A pesar de su importante rol en los ecosistemas, diversos estudios muestran un aumento en la mortalidad de las colonias de abejas (Parra S, 2023). Bajo las diversas amenazas que, enfrentan las abejas se encuentran, enfermedades, polución, agricultura industrial, insecticida y herbicidas. Son estos últimos que no solo afectan la vida de las abejas, si no también aquellos productos generados por ella (Nick A. Romero, 2022).

El acaro *Varroa destructor* es el principal parásito de la *apis mellifera* puede causar el colapso de una colmena si no se trata, por lo que es necesario controlarlo para mantener una colmena saludable. Se han usado acaricidas como el fluvalinato, el amitraz, el coumaphos, la flumetrina para controlar la varroa; sin embargo, pueden quedar residuos de estos en la cera y en la miel (María Jesús Gracia, 2017.). Por otra parte, el polen que las abejas recogen de los cultivos tratados con plaguicidas, y que ellas mismas almacenan suelen contener residuos y con el tiempo estos residuos suelen quedarse en la cera de abeja del panal (Fernando Tortosa, 2023).

Es por ello por lo que, en los últimos años se han investigado diferentes metodologías para eliminar los pesticidas de las ceras de abejas. Estudios recientes han demostrado una alta eficiencia de remoción de estos compuestos al utilizar Metanol (Luna et al., 2021) como solvente para la purificación de cera de abeja, estudios previos realizados en el laboratorio USM Bee Lab de la Universidad Técnica Federico Santa María, Mostraron buenos resultados usando una mezcla de metanol-agua 50:50 [v/v], sin embargo, Existe aún un desafío con respecto a un grupo de pesticidas con acción acaricida cuya estructura química, tiene afinidad por la mezcla lipofílica de la cera de abeja, estos suelen permanecer en la cera durante más tiempo, es por ello que, el objetivo de este trabajo será proponer tres nuevos métodos de purificación para cera de abeja contaminada con pesticidas (imidacoprid, coumaphos, tau-fluvalinato-y amitraz) mediante el uso de soluciones hidroalcohólicas.

2.OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es proponer a escala de laboratorio una nueva metodología de purificación de ceras con mayor eficiencia en la remoción de compuestos liposolubles (acaricidas) en base a una solución hidroalcohólica que permita ampliar la

capacidad de purificación a compuestos químicos hidrosolubles y liposolubles remanentes en ceras.

2.1 Objetivos específicos

- 1.Determinar la eficiencia de remoción de tres métodos usando soluciones hidro alcohólicas con etanol, propanol y butanol.
- 2.Optimizar el método analítico para análisis de agroquímicos y acaricidas en cera, usando UHPLC-MS/MS
- 3.Analizar los parámetros de calidad de las ceras antes y después del tratamiento de purificación, mediante el estudio de propiedades físico/químicas.

3.ANTECEDENTES GENERALES

3.1) Descripción de las abejas

Los himenópteros constituyen uno de los órdenes más diversos de insectos, con aproximadamente 146.000 especies descritas (Klopstein et al., 2013). Dentro de este orden, las abejas se destacan como un grupo particular. En la actualidad, se reconocen siete familias de abejas en el mundo: cinco de lengua corta (Stenotritidae, Colletidae, Andrenidae, Halictidae y Melittidae) y dos de lengua larga (Megachilidae y Apidae) (Michener, 2000).

Una de las abejas polinizadoras más conocidas es la *Apis mellifera*, nativa de África, el oeste de Asia y Europa (Michener, 2007). Esta especie ha sido introducida por el ser humano en todos los continentes, excepto en la Antártida, principalmente para la producción de miel y, en segundo lugar, para la polinización de cultivos. Hoy en día, se considera el animal más utilizado en esta labor (Garibaldi et al., 2013). Se calcula que más del 80% de las 250 mil plantas con flor conocidas necesitan polinización para llevar a cabo su reproducción sexual(Coro Arizmendi, 2009).

Las abejas melíferas son polinizadores altamente eficaces, puesto que tienen un cuerpo cubierto de pelos con el que recogen fácilmente los gránulos de polen cuando se mueven en el interno de las flores, además de visitar solamente una especie de flor durante cada uno de sus viajes(Bradbear, 2005).

Se puede observar en la figura 1 las partes de una abeja.

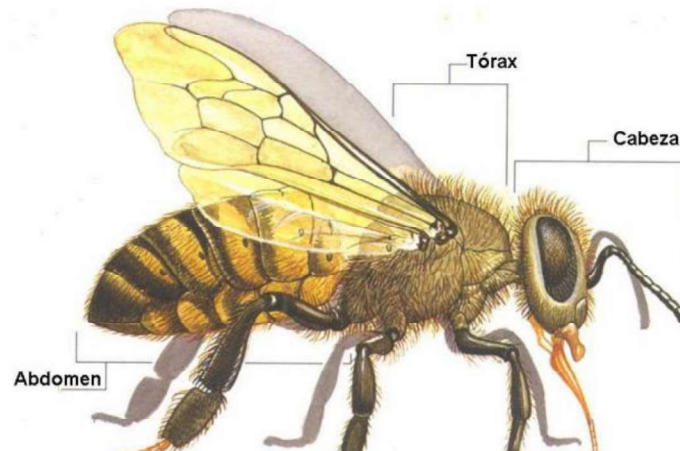


Figura 1 Partes de una abeja Garibaldi et al., 2013

La *Apis mellifera* se caracteriza por ser un animal social que vive en colmenas. El número de abejas en una colmena puede llegar a 40,000, dependiendo de la época del año (Miranda et al., 2015). Dentro de la colmena conviven 3 tipos de abejas:

- **Reina:** Es el individuo más grande de la colonia, cuya función es poner huevos que, eventualmente, dan origen a obreras, zánganos y otras reinas. Suele tener un abdomen alargado y alas cortas, ya que su morfología le permite poner huevos (Miranda et al., 2015). Una reina fecundada puede llegar a poner entre 800 y 2,000 huevos (Efrén et al., 2012)
- **Zángano:** Los zánganos son los machos de la colonia, durante los meses que hay flores existe mayor abundancia de zánganos (Efrén et al., 2012). La tarea de los zánganos es fecundar a la reina virgen y dar calor a la colmena.
- **Obrera:** El número de abejas obreras en una colmena oscila entre 20.000 y 60.000 siendo las más numerosas de la colonia (Miranda et al., 2015), estas abejas desempeñan diversas funciones, como la recolección de alimento, la producción de

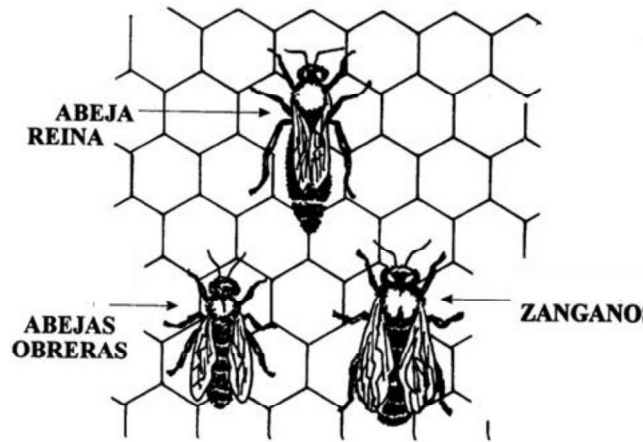


Figura 2 Abejas en una colmena (Efrén et al., 2012)

jalea real, la regulación de la temperatura de la colmena, el cuidado de las larvas y la reina, así como la limpieza de la colmena, entre otras tareas. (Efrén et al., 2012)

3.2) Productos de la Colmena

De las abejas se puede obtener diferentes productos apícolas de alta demanda comercial como son la miel, polen, apitoxinas, cera, jalea real y propóleo.

- **Miel:** La miel, según el Codex alimentario de 1994, es una sustancia dulce natural producida por abejas a partir del néctar de flores y secreciones de plantas. Es viscosa, no fermentada y varía en color de ámbar a marrón, con características que dependen del néctar utilizado. Además de ser un alimento energético, la miel tiene propiedades terapéuticas, como antisépticas y cicatrizantes, y se usa en cosméticos(ODEPA, 2015).

Polen: El polen es un polvo, más o menos grueso que representa el elemento masculino de la flor y que las abejas recolectan y almacenan(Miranda et al., 2015). Este polen es fundamental para la alimentación de las larvas dentro de la colmena previa adición de enzimas y reposo al interior de la colmena. Su composición es variada, pero se considera un alimento altamente proteico convirtiéndose en un complemento vitamínico natural de excelente calidad.(ODEPA, 2015)

- **Propóleo:** Es una mezcla de resinas recolectadas por las abejas de las yemas y partes dañadas de árboles la cual es almacenada y procesada en la colmena. Es utilizado por las abejas para tapar pequeños agujeros en la colmena y barnizar la misma, para evitar pérdidas de calor(Miranda et al., 2015; ODEPA, 2015). En promedio, cada colmena produce alrededor de 50 gramos de propóleo al año. Este material se

emplea en la fabricación de cosméticos, barnices, pinturas y medicamentos, y posee propiedades antiinflamatorias y antitóxicas.(ODEPA, 2015)

- **Cera:** Es una sustancia secretada por las glándulas ceríferas de las abejas obreras entre 10-15 días de edad. Esta está compuesta principalmente de esteroides de alcoholes, y ácidos grasos, es de color blanquecino cuando esta recién secretada y con el tiempo se va tornando amarillento(Patricia Vit, 2005).

Se clasifican en 2 tipos: los opérculos, de alta calidad y precio, y la cera vieja, que proviene del reciclado de panales y es de menor costo.(Consorcio de Desarrollo Tecnológico Apícola S.A, 2014; ODEPA, 2015)

Los bloques o cerones se venden en bruto a las industrias especializadas, que se encargan de elaborar nuevas láminas estampadas y preparadas para colocar en los cuadros a introducir en las colmenas. Sin embargo, la venta de bloques de cera está disminuyendo debido a preocupaciones sobre la calidad de las láminas estampadas, que a menudo contienen parafina, y el riesgo de contaminación que podría afectar la salud de las colmenas. Por ello, se observa cada vez una mayor presencia de apicultores que estampan su propia cera.(Consorcio de Desarrollo Tecnológico Apícola S.A, 2014)

- **Jalea real:** Es una sustancia producida por glándulas especiales de las abejas con el fin de alimentar a las larvas de obreras y zánganos en sus primeros días, en cambio las larvas reinas y abeja reina se alimentan toda su vida. La jalea real es rica en proteínas, aunque también es rica en azúcares, vitaminas y otros compuestos.(ODEPA, 2015)
- **Apitoxina:** La apitoxina Corresponde al veneno producido por la abeja y corresponde a una mezcla compleja de enzimas, péptidos y aminoácidos. Se produce en las glándulas situadas en la parte posterior del último segmento abdominal de la abeja. El veneno de abeja tiene propiedades bactericidas, hemolíticas, anticoagulante y tónicas. Es el mayor vasodilatador conocido, fluidifica la sangre al ser anticoagulante. Sus principales usos son terapéuticos (apiterapia), para el tratamiento de la artritis, esclerosis y reumatismo.(ODEPA, 2015)

3.3) Pesticidas en abejas

El concepto de pesticida o plaguicida se define de acuerdo con la Ley N°2.763, artículo 2 como “Compuesto químico, orgánico o inorgánico o sustancia natural que se utilice en el medio ambiente para combatir malezas, enfermedades o plagas potencialmente capaces de

producir daños en el hombre, animales, plantas, semillas y objetos inanimados”(Ulibarry et al., 2020). Por otra parte El código internacional de conducta sobre la distribución y uso de plaguicidas de la Food and Agriculture Organization (FAO) establece que ““es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales”(FAO, 2020)

Los pesticidas pueden tener diferentes clasificaciones, esto ayuda a identificar con mayor facilidad los riesgos que generan. Estos se pueden clasificar según su composición Química, según el organismo a controlar, Según su grado de toxicidad, Según su persistencia en el ambiente, entre otros(Omar Díaz, 2018).

3.4) Efecto sobre las abejas

3.4.1) Neonicotinoides

Los neonicotinoides son una clase de pesticidas persistentes que se utilizan en cultivos a nivel mundial. Actúan en el sistema nervioso de los insectos al unirse a los receptores de acetilcolina, Provocando un comportamiento anormal, inmovilidad y muerte. Aunque su toxicidad es baja para mamíferos y humanos, tienen una toxicidad intrínseca relativamente elevada para las abejas(Iwasa et al., 2004).

Actualmente los neonicotinoides se utilizan en los cultivos de papa, arroz, maíz, cereales, frutas, hortalizas, plantas ornamentales, semillas, entre otros. Lo que genera la exposición de los polinizadores mediante la ingestión de polen, néctar y agua contaminada, además del contacto directo con aerosoles y las superficies de las plantas tratadas(Ulibarry et al., 2020).

Por otra parte, los neonicotinoides pueden persistir en los suelos durante meses y años de una sola aplicación. Se han encontrado residuos en plantas hasta seis años después de su aplicación empapando el suelo(Ulibarry et al., 2020).

Los neonicotinoides, incluso cuando se aplican a semillas, pueden contaminar plantas cercanas, incluidas flores silvestres, que visitan las abejas. Esta contaminación se debe principalmente por el contacto directo con hojas tratadas con neonicotinoides muy tóxicos, causando la muerte de las abejas(Ulibarry et al., 2020).

En las abejas a niveles subletales de exposición a neonicotinoides pueden experimentar dificultades para volar y navegar, reducción de la sensibilidad gustativa, y retrasos en su habilidad para aprender nuevas tareas, todos factores que impactan sobre su habilidad para forrajear y sobre la productividad de la colmena(Ulibarry et al., 2020).

3.4.2) Acaricidas

El acaro *Varroa destructor* el cual afecta tanto a las crías como a las abejas adultas, es causante de la varroosis el cual es en la actualidad la enfermedad que provoca más daño en la apicultura a nivel mundial. La varroosis es una acaro externa la cual no solo se favorece de su acción expoliadora, sino que también favorece la aparición generalizada de infecciones víricas.

La erradicación total del parásito Varroa en las colmenas es prácticamente imposible, ya que siempre quedará alguna hembra en las colmenas o enjambres silvestres. Por lo tanto, el objetivo es minimizar su presencia. Generalmente, se realiza un tratamiento en otoño, después de la cosecha, ya que es un período con alta población de varroas y es crucial para proteger la cría, garantizando abejas de invierno de calidad. Si los chequeos en primavera revelan una alta carga parasitaria, se repite el tratamiento.

Durante los años 2003 a 2008 en 197 muestras de cera recogidas de colmenares e industrias cereras de España, las ceras españolas acumulan principalmente clorfenvinfos y tau-fluvalinato, dos de los acaricidas más usados por el sector apícola español desde 1985. El clorfenvinfos se halló en el 95.9% de las muestras analizadas con un rango comprendido entre $19,6 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right]$ y $10640 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right]$. El tau-fluvalinato estaba presente en el 93.6% de las muestras analizadas y un rango comprendido entre los $27 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right]$ y los $88.659 \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right]$. los principales acaricidas encontrados en la cera ha sido el coumafós, el amitraz y la acrinatrina, con subidas importantes de estos dos últimos compuestos (Facultad de Farmacia de la universidad de Granada, 2016).

Algunos acaricidas para la varroa usados en Chile son:

N° Registro Sag	Nombre Generico	Nombre Comercial	Forma Farmaceutica	Indicacion	Importador
1917	flumetrina 3,6 mg	verostop	Tiras	Control de Varroa destructor	Centrovét Ltda.
2040	Timol, Levomentol, Aceite de Eucaliptus, Alcantor	alvar	Tablilla evaporante	Control de Varroa destructor	Agro-Apicultura Ltda.
2394	Amitraz 500 mg	Apitraz	Tiras	Control de Varroa destructor	Agrovét SPA
2470	Amitraz 4,13%	no tiene	Tiras	Control de Varroa destructor	Apilab Chile SPA
2578	Amitraz 500 mg	Apivar	Tiras	Control de Varroa destructor	Centrovét Ltda.
2587	Timol 25%	Apiguard	Gel	Control de Varroa destructor	Inv.asesorias y comercializadora Profeed Ltda

Tabla 1 Acaricidas para la varroa aprobados en Chile (SAG, 2023)

3.4.3) Plaguicidas objeto de estudios

- **Fluvalinato:** El fluvalinato es un insecticida foliar y acaricida de origen sintético, desarrollado a partir de las piretrinas, compuestos naturales extraídos de las flores del crisantemo. Los piretroides, entre los que se incluye el tau-fluvalinato, son altamente lipofílicos y se consideran moléculas de toxicidad moderada. Su modo de acción consiste en alterar la permeabilidad de los canales de sodio en las membranas

de las células nerviosas, lo que provoca despolarización y una hiperexcitabilidad prolongada(Neira et al., 2011).

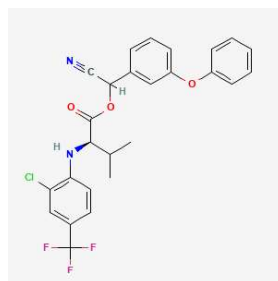


Figura 3 Molécula Tau-fluvalinato (Pubchems,2021)

- **Coumaphos:** El coumaphos es un organotiofosfato acaricida y muestra la actividad dañina de inhibición de la colinesterasa, como ocurre con otros compuestos organofosforados, ha sido prohibido en muchos países, actualmente aparece como residuo en miel y cera de abejas. Estos residuos en la miel ocurren como resultado de la difusión del ingrediente activo desde los panales de cera, los cuadros, las paredes de las colmenas y las bases hechas de cera de abejas contaminada(Adamczyk et al., 2010).

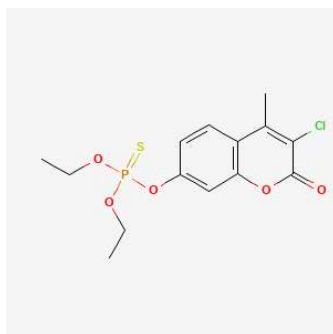


Figura 4 Molécula Coumaphos(pubchem, 2021)

- **Amitraz:** El Amitraz, es un compuesto a base de formamida. Es un pesticida y acaricida de amplio espectro además de ser uno de los acaricidas más importantes y comúnmente utilizados para el manejo de *Varroa destructor*, el parásito externo de las abejas melíferas. En apicultura, el Amitraz puede administrarse de dos maneras: mediante tiras de polietileno de larga duración impregnadas con el insecticida o a través de tabletas combustibles de corta duración para fumigar(Ramesh C. Gupta, 2014).

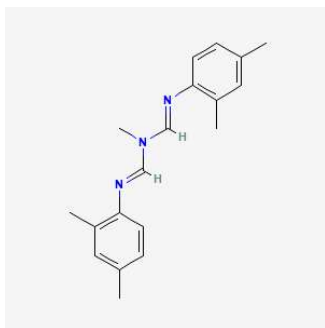


Figura 5 Molécula Amitraz (pubchem,2021)

- **Imidacoprid:** El imidacoprid es un insecticida sistémico de nitroguanidina perteneciente a la familia de los neonicotinoides. Funciona como un agonista del receptor de acetilcolina y se distingue por su alta selectividad tóxica, debido a su mayor afinidad por los receptores nicotínicos de acetilcolina de los insectos en comparación con los de los vertebrados. Este compuesto es altamente eficaz contra una amplia variedad de larvas de insecto. Puede actuar por contacto o ingestión, y sus excelentes propiedades sistémicas, junto con su acción prolongada, lo hacen ideal para aplicaciones en tratamientos foliares, del suelo y de semillas (Verine Suchail et al., 2001).

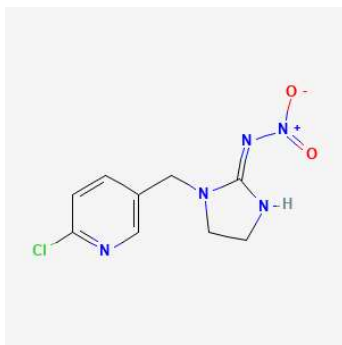


Figura 6 Molécula Imidacoprid (pubchem ,2022)

3.5) Situación actual sobre la apicultura en Chile

3.5.1) Universo de apicultores

En Chile la cadena apícola está integrada por más de 10.000 apicultores, en su mayoría de la Agricultura Familiar Campesina (AFC). Su enfoque principal es la producción de miel y la variedad de productos derivados de la colmena. Además, desempeñan un papel crucial en la sostenibilidad y el fortalecimiento del sistema alimentario nacional, al proporcionar servicios de polinización que facilitan una producción agroalimentaria de reconocimiento internacional (ODEPA, 2023).

El 99% de los colmenares se ubican principalmente entre las regiones de Atacama y Aysén, estos producen miel, material vivo, servicios de polinización y otros productos de la colmena, que son destinados tanto al mercado nacional como internacional(ODEPA, 2023)

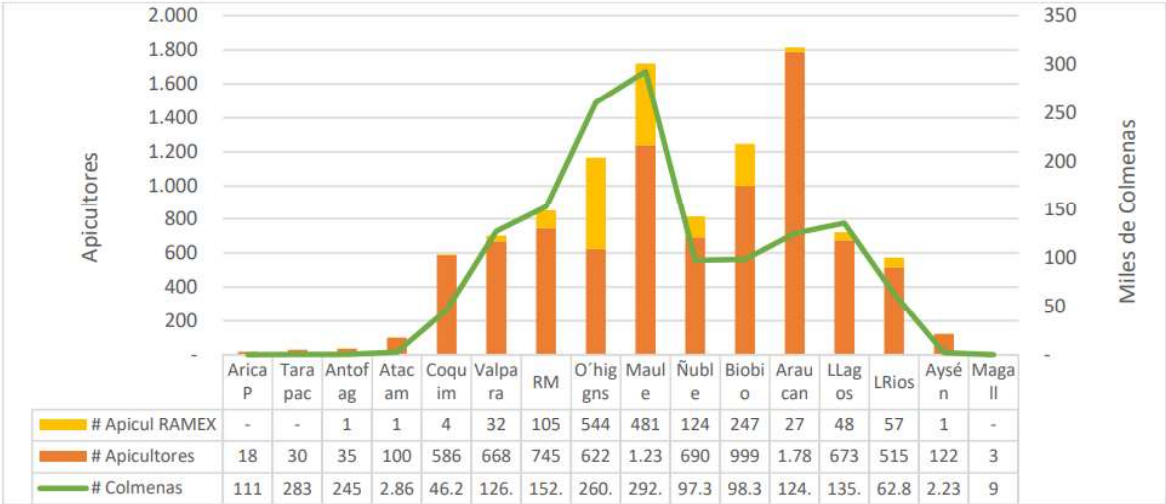


Figura 7 Gráfico sobre número de apicultores, exportadores y colmenas por región

Si observamos el grafico extraído desde la ODEPA en 2022, las regiones con más apicultores/as fueron Maule y La Araucanía (17% cada una), seguidas de O'Higgins y Biobío (12% cada una). Maule también destacó como la principal región exportadora de miel, con un 29% de los apicultores exportadores, y O'Higgins lideró con un 47% de apicultores exportadores registrados.

Las mayores variaciones en el número de apicultores/as respecto a 2021 ocurrieron en Ñuble (aumento del 18%) y Los Lagos (16%). En cuanto a colmenas, Maule, O'Higgins y Metropolitana concentraron la mayor parte. Tarapacá tuvo el mayor incremento en colmenas (54%), mientras que Los Lagos y Ñuble vieron disminuciones.

La producción de miel fue la actividad principal de los apicultores/as, representando el 98% de las actividades, seguida por la polinización (26%) y la producción de material vivo (16%).

3.5.2) exportación de miel y otros productos apícolas

Como se puede observar en los datos presentados por la ODEPA, en 2022 las exportaciones de productos apícolas de Chile alcanzaron un total de USD 17,27 millones FOB, un aumento del 23% en comparación con el año anterior. El 97,5% de este valor correspondió a mieles

Tabla
Aduana

Producto de Colmena	Volumen(ton)				Valor (Millones USD FOB)				Variacion %	
	Enero-Diciembre		Diciembre-Julio		Enero-Diciembre		Variacion %	Diciembre-Julio		22/23
	2021	2022	2021	2023	2021	2022	21/22	2021	2023	
Miel natural	2.948,80	3,869	2.704	1932.20	12.1	15,4	27	10,8	6,23	-42
Miel Organica	346,3	312,2	261.3	181.8	1.6	1,4	8	1,19	0,75	-37
Cera de Abeja	sin info	sin info	sin info	sin info	sin info	sin info	sin info	sin info	sin info	sin info
Material Biologico(miles de unidades)	12,8	12,9	13	15,6	0,33	0,42	29	0,42	0,67	59
TOTAL					14,03	17,47	23	12,41	7,66	-38

naturales y orgánicas, mientras que el 2,5% fue de material biológico (abejas reinas y paquetes de abejas). No se registraron exportaciones de cera de abejas.

El volumen de exportación de mieles naturales y orgánicas fue de 4.184,6 toneladas, valoradas en USD 16,85 millones FOB, lo que representó un incremento del 27% tanto en volumen como en valor respecto al año anterior. Sin embargo, las mieles orgánicas vieron una reducción del 8% en su valor. La mayoría de las mieles se exportaron a granel (98%) en tambores de 300 kilos.

Por otro lado, el material biológico exportado alcanzó 12,9 mil unidades, vendidas por USD 42 mil FOB, lo que supuso un aumento del 29% en su valor (ODEPA, 2023).

Al finalizar la temporada 2022-23 (julio 2023), las exportaciones de mieles naturales y orgánicas cayeron a 2.115 toneladas, valoradas en USD 6,98 millones FOB, lo que representó una disminución del 39% en valor. En contraste, el material biológico exportó USD 670 mil FOB, un incremento del 59% en comparación con el mismo periodo anterior(ODEPA, 2023).

Sin embargo, en 2020, el valor total de los productos de exportación de la colmena alcanzó los USD 6,53 millones FOB, lo que representó una disminución del 50,2% en comparación con el año anterior. Del total exportado, el 94,4% correspondió a mieles naturales y orgánicas, mientras que el 5,6% restante se distribuyó entre cera de abejas y material vivo, compuesto por abejas reinas y paquetes de abeja(ODEPA, 2021).

4.METODOS ANALÍTICOS PARA MATRIZ DE CERA

4.1 Preparación de muestra

Para la determinación cuantitativa de plaguicidas en cera, cabe destacar en primer lugar que a la hora de realizar extracción de plaguicidas en cera de abeja se emplean siempre disolventes orgánicos solos o en mezcla o mezcla de disolventes orgánicos con agua.

En la preparación de muestras para el análisis de cera de abeja, se han identificado variaciones en los métodos utilizados. Uno de los enfoques para la extracción de plaguicidas consiste en disolver la cera en hexano, un solvente no polar, con el objetivo de obtener una solución homogénea en una única fase. Posteriormente, se realiza una extracción sólido-líquido, empleando tierras diatomeas (Boi et al., 2016), o el uso de hexano junto al uso de acetonitrilo y metanol para lograr una extracción líquido-líquido(Jiménez et al., 2005a). Otra posibilidad es la realización de la extracción sin la necesidad de disolver la cera, ya sea usando tierras diatomeas en una extracción sólido- líquido(Lodesani et al., 2008) o extracción líquido-líquido con baño de ultrasonido(Lodesani et al., 2008)

Aunque los estudios anteriormente mencionados mencionan buenas recuperaciones, QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe) es el método de preparación de muestra que proporciona mejores resultados(Anastassiades et al., 2003).

El método QuEChERS diseñado por Michelangelo Anastassiades consiste en los siguientes pasos(Anastassiades et al., 2003)

Una primera etapa de preparación y extracción de la muestra, en la que se añade acetonitrilo como solvente de extracción para luego fundir y agitar logrando la homogenización de la muestra, se puede añadir sales como $MgSO^4$, ácidos y tampones para mejorar la eficiencia de la extracción(Anastassiades et al., 2003).

En la segunda etapa de preparación de muestras, se realiza una limpieza exhaustiva del extracto mediante la adición de sorbentes especializados. Estos materiales tienen la función de retener componentes indeseados de la matriz que podrían generar interferencias en el análisis o picos no deseados en el cromatograma. Según la literatura, los sorbentes más utilizados para este propósito son PSA (amina primaria y secundaria) y C18 (octadecilcilano), cada uno con propiedades específicas que optimizan la purificación del extracto.

- **PSA (amina primaria y secundaria):**

Este sorbente es especialmente eficaz para eliminar compuestos polares como ácidos grasos, azúcares y ácidos orgánicos presentes en la cera de abeja. Gracias a su afinidad química, retiene estas sustancias, permitiendo que los analitos de interés pasen sin interferencias significativas.

- **C18 (octadecilcilano):**

Con su naturaleza no polar, el C18 es ideal para retener lípidos y esteroides que también se encuentran en la cera y pueden afectar la calidad del análisis. Este sorbente actúa atrapando estas moléculas apolares, asegurando un extracto más limpio y adecuado para la detección de los compuestos objetivo.

La combinación de estos sorbentes permite una purificación eficiente, mejorando la sensibilidad y especificidad del análisis cromatográfico al minimizar interferencias de la matriz(Anastassiades et al., 2003; Rezić et al., 2005)

4.2 Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas más utilizadas son, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)(Niell et al., 2014a; Steinborn et al., 2017; Wiest et al., 2011; Yáñez et al., 2013) y la cromatografía de gases(Anastassiades et al., 2003; Jiménez et al., 2005b).

Entre los detectores encontrados predominan la espectroscopia de masas(Lodesani et al., 2008), simple o en tándem y de cuadrupolo simple(Lodesani et al., 2008) o triple

cuadrapolo. Los detectores de captura electrónica (ECD) son los Segundos más utilizados utilizados, también existen los detectores de nitrógeno fosforo, siempre y cuando los pesticidas posean nitrógeno y fosforo(Serra-Bonvehí & Orantes-Bermejo, 2010). Existen otros detectores como el detector de ionización de llama (FID) (Bogdanov et al., 2004), sin embargo, su uso no es tan frecuente.

En el análisis de pesticidas en cera de abeja, las columnas cromatográficas más utilizadas actualmente son las capilares, que han reemplazado a las antiguas columnas empaquetadas debido a su mayor eficacia y reproducibilidad(Frison et al., 1999). Estas columnas suelen emplear fases estacionarias diseñadas específicamente para el análisis de plaguicidas(Bonzini et al., 2011). Además, los disolventes utilizados en la preparación de muestras son de calidad analítica, adecuados para garantizar resultados confiables.

4.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica analítica avanzada que integra la separación de compuestos proporcionada por el HPLC con la alta selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas. Esta combinación permite obtener información tanto cualitativa como cuantitativa de las muestras analizadas.

El sistema HPLC es una herramienta analítica que facilita la separación, identificación y cuantificación de compuestos semivolátiles y no volátiles presentes en muestras líquidas. Durante el proceso, la muestra líquida se inyecta junto con una fase móvil compuesta por un disolvente o diluyente, que es impulsado por una bomba. Este flujo se dirige a través de una columna que contiene una fase estacionaria a una presión específica, permitiendo el paso continuo de líquidos a través de capilares y tubos de conexión. Los analitos se separan en la columna debido a las diferentes interacciones con la fase estacionaria, lo que resulta en tiempos de retención distintos. Estos tiempos comienzan desde la inyección de la muestra hasta la aparición de los picos máximos en el cromatograma, los cuales corresponden a la señal detectada del analito. (ThermoFisher, s.f.)



Figura 8 Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 UHPLC

4.3 Espectrometría de Masas

El espectrómetro de masa utiliza una fuente de ionización o nebulizador que a través de un campo electromagnético emite una corriente de iones en fase gaseosa que irradia la molécula generando una respuesta según la masa/carga (m/z) de molécula midiendo la intensidad relativa de las diferentes masas (Espectrometría de masas, n.d.).



Figura 9 Espectrometro triple cuadrupolo

5.METODOLOGIA

El presente trabajo tendrá como objetivo el uso de un método de extracción de pesticidas en cera de abeja contaminadas, tomando como base algunos resultados previos reportados por (Luna et al., 2021), y dos memorias previamente desarrolladas en el laboratorio USM Bee lab

5.1 Materiales

En esta sección se detallarán los materiales usados en las etapas de contaminación de cera de abeja, purificación de cera de abeja y los análisis físico/químicos.

5.1.1 Contaminación de ceras

- Balanza granataria
- 4 Bandeja de aluminio
- 1 Cuchillo
- 1 Espátula
- 4 Cera de abeja 300 [g]
- 1 Matras aforado 50 [mL]
- 1 Micropipeta 100 [μL]
- 1 Placa calefactora
- 1 Vaso Precipitado 2 [L]
- 1 Papel aluminio 3 [m]

Reactivos

- Imidacoprid
- Coumaphos
- Tau-Fluvalinato
- Amitraz

Equipo

5.1.2) Purificación de ceras

- 1 Barra magnética
- 1 Placa calefactora
- 1 Probeta 1 [L]
- 1 Pinza doble para bureta (Fisher)
- 1 Vaso precipitado 2 [L]
- 1 Papel aluminio 3 [m]
- 1 DLS Digital Overhead Stirrer,VELP Scientifica
- 1 Placa calefactora
- 1 Termocupla

5.1.3) Optimización de parámetros químicos UHPLC-MS/MS

- 4 Bandeja para pesar
- 1 Espátula
- 1 Gradilla para tubos
- 1 Micropipeta 200 [μL]-1000 [μL]
- 1 Puntas de micropipeta 200 [μL]- 1000 [μL]

- 24 Viales 2 [ml] con tapa ámbar

Reactivo

- Imidacoprid
- Coumaphos
- Fluvalinato
- Amitraz
- Metanol UHPLC
- Agua 0,1% ácido fórmico

Equipo

- UHPLC- Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific
- Detector de Masa/Masa TSQ Fortis, Thermo Scientific.

5.1.4) Índice de acidez e Índice de saponificación

- 1 DLS Digital Overhead Stirrer,VELP Scientifica
- 1 Barra magnética
- 2 Bandeja de metal
- 2 Placa calefactora
- 1 Probeta 1 [L]
- 1 Pinza doble para bureta (Fisher)
- 1 Termocupla
- 1 Papel aluminio 3[m]
- 16 Matraz aforado 250 [mL]
- 1 Soporte universal
- 6 Vasos precipitados
- 1 Gafas de seguridad
- 1 Guantes pares
- 1 Micropipeta 100[μ L]-1000[μ L]

Reactivos

- Hidróxido de potasio
- Etanol
- Ácido clorhídrico 37%
- Fenolftaleína

5.1.5) Temperatura de fusión

- 12 Capilares de vidrio

Equipo

- Melting Point Apparatus SMP3

5.1.6) espectroscopia de fuerzas

- 1 Placa calefactora
- 3 Placa Petri
- 1 Bandeja metálica
- 1 Papel aluminio rollo 3 [m]

Equipo

- Nanosurf FlexAFM

5.1.7) análisis de humedad

- 3 Muestras de cera
- 9 Placa de Petri
- 1 Contenedor plástico

Equipo

- Estufa

5.1.8) Método de extracción por QuEChERS

- 12 Tubos de centrífuga 15 [mL]
- 4 Bandeja para pesar
- 1 Espátula
- 1 Gradilla para tubos
- 1 Micropipeta 200 [uL]-1000 [uL]
- 1 Puntas de micropipeta 200 [uL]- 1000 [uL]
- 24 Viales 2 [mL] con tapa ámbar
- 3 Jeringa 5[mL]
- 12 Millex Syringe-drive Filter Unit 0.2 [µm]

Reactivos

- Agua mili Q
- Acetonitrilo
- C-18
- PSA

Equipos

- Ultrasonido Hanna Mix H610
- Balanza analítica Sartorius
- Eppendorf Centrifuge 5804 R

5.2) Experimentación

5.2.1) Contaminación de cera

El primer paso es pesar en cada bandeja de aluminio 300 [g] de cera de abeja y separarlas en bandejas de aluminio, marcándolas según el método que ocuparemos con cada una. Se asignó para cada método un alcohol para limpieza, siendo etanol para M1, propanol para M2, butanol para M3 y M4, que será la cera Control.

El siguiente paso fue la selección de los pesticidas. Para ello, nos basamos en estudios previos, especialmente en los hallazgos de la memoria de la Ing. Macarena Quilodrán (2023). En este informe se encontraron resultados positivos en la remoción de pesticidas clasificados como insecticidas, mientras que los acaricidas mostraron un bajo porcentaje de remoción. Por esta razón, nuestro proyecto se centrará en los acaricidas, además de incluir un insecticida que presentó el porcentaje de remoción más alto en la memoria antes mencionada.

Una vez seleccionados los pesticidas, se calculó la concentración inicial basándonos en la memoria de Macarena Quilodrán y con el fin de que los resultados fueran comparables, estableciendo una concentración de 1000 [ppb] para garantizar la comparabilidad de los datos. Se pesaron 0,00154 [g] de cada pesticida, que se trasladaron a un matraz aforado de 50 [ml], el cual se aforó con acetona.

Preparada la solución madre, se fundieron las ceras en sus respectivas bandejas y, una vez fundidas, se añadió 1 [ml] de solución madre a cada bandeja. Para lograr una distribución homogénea, se



Figura 10 Cera dopada con pesticidas

adicionaron 0,2 [ml] de la solución en cada esquina y 0,2 [ml] en el centro, repitiendo este proceso en las cuatro bandejas. Una vez terminado el proceso de contaminación, se dejaron reposar en un lugar fresco y protegidas de la luz durante dos días para lograr la solidificación de la cera y la evaporación de la acetona.

Una vez transcurridos los dos días, se cortaron en trozos más pequeños y se intercambiaron fragmentos entre las bandejas con el objetivo de igualar la concentración promedio en cada una de ellas.

5.2.1) Purificación de ceras

Una vez que las ceras de abejas fueron correctamente almacenadas, se procedió a su limpieza. Para ello, se establecieron los parámetros operativos, basándonos en los estudios más recientes,

especialmente en la memoria de la ingeniera Macarena Quilodrán (2023). Se utilizará una agitación de 500 [rpm] y una proporción de 1:4 gramos de cera de abeja por mililitro de solvente.

Método1 (M1): El método de limpieza M1 utiliza una solución limpiante de etanol-agua al 50% (v/v). Dado que la cera de abeja tiene un punto de fusión de 61 [°C] a 65 [°C], es crucial operar a una temperatura superior a 65 °C durante el proceso. Sin embargo, la temperatura de ebullición de la mezcla de etanol-agua al 50% v/v es de 80 [°C]. Es importante evitar la evaporación de la solución limpiante, por lo tanto, se estableció una temperatura de operación máxima de 80 [°C].

Una vez seleccionada la solución limpiadora, se preparó un vaso precipitado de 2 L en el que se agregó 1,2 L de una mezcla de etanol-agua al 50% v/v. Este conjunto se calentó en un baño de María hasta alcanzar los 80 [°C]. Al llegar a la temperatura deseada, se incorporaron 300 [g] de cera de abeja, y se esperó hasta que la cera estuviera completamente fundida. Para mantener la temperatura en el vaso, se cubrió completamente con papel de aluminio. Una vez que la cera se fundió, se agitó la solución durante 10 minutos a una velocidad constante de 500 rpm. Tras este tiempo, se dejó enfriar la solución, preparándose para su posterior filtrado una vez que la cera se solidificara. Ya solidificada la cera de abeja se filtra la solución limpiante y la cera de abeja se envuelve en aluminio y se almacena.



Figura 12 Proceso de purificación de cera

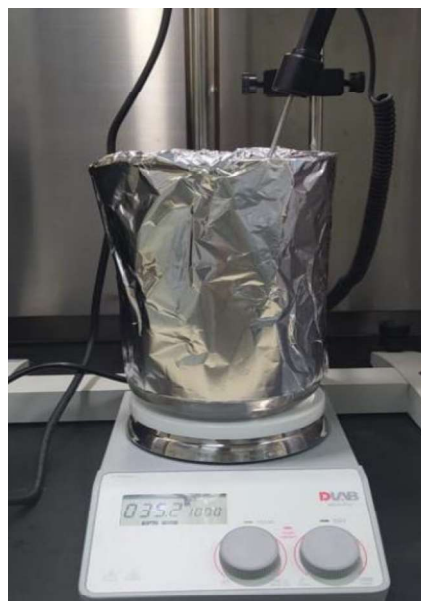


Figura 11 Proceso de purificación de cera etapa de calentamiento

Método 2(M2): El método de limpieza M2 utiliza la solución limpiante Propanol-agua 50% v/v, es importante remarcar que la temperatura de operación debe ser superior a las 65 [°C] para lograr fundir la cera de abeja y que la temperatura de operación es de 80[°C], esto con el fin de evitar una posible evaporación de la solución limpiante la cual tiene un intervalo de ebullición de 81[°C] a 83 [°C] (Kara, 2022) y, además, tratar de mantener las condiciones lo más parecidas al Método M1

Para el método M2, se agregó 1,2 [L] de una solución limpiadora de 2-propanol y agua al 50% (v/v) en un vaso precipitado de 2 [L]. La mezcla se calentó hasta alcanzar 80 [°C]. Es importante señalar que este trabajo se realiza bajo campana, por lo que se envolvió el vaso precipitado en papel de aluminio para mantener la temperatura y evitar pérdidas. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se incorporó la cera de abeja y se volvió a tapar el vaso precipitado, esperando a que la cera se fundiera por completo.

Una vez que la cera estuvo completamente fundida, se agitó la mezcla a 500 rpm durante 10 minutos. Al finalizar este tiempo, se dejó enfriar la mezcla hasta que la cera solidificara. Finalmente, se filtró la solución limpiadora, y la cera de abeja se envolvió en papel de aluminio y se almacenó.

Método 3(M3): El método de limpieza M3 utiliza una solución limpiadora compuesta por butanol y agua. Para preparar esta solución, se emplearon las siguientes cantidades: 300 [ml] de 2-butanol, 300 [ml] de 1-butanol y 600 [ml] de agua. La limpieza se llevó a cabo bajo una campana extractora, manteniendo las condiciones descritas en los dos métodos anteriores, con una temperatura de operación de 80 [°C].

Se colocó el vaso precipitado con la solución limpiadora en un baño María hasta alcanzar la temperatura de operación. Para minimizar las pérdidas de calor durante el trabajo en la campana, se envolvió el vaso en papel aluminio. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se añadieron 300 gramos de cera de abeja y se esperó a que se fundiera completamente.

Después de que la cera se fundió, se agitó la mezcla durante 10 minutos a 500 rpm. Sin embargo, se observó que, a esa velocidad de agitación, la mezcla de la solución limpiadora y la cera de abeja formó una emulsión. Al dejar enfriar la mezcla para proceder a su filtración, se notó que, debido a la emulsión, el proceso tomó mucho más tiempo en comparación con los métodos anteriores.

Una vez filtrada, la mezcla se mantuvo bajo la campana durante una semana. Este tiempo prolongado se debió principalmente a la elevada toxicidad del butanol, ya que la cera de abeja retuvo una gran cantidad de este solvente.



Figura 13 Ceras Almacenadas (M1,M2,M3 y patrón)

5.2.3) Análisis Físico/Químico

Las ceras Limpiadas con cada método M1, M2 y M3 fueron almacenadas y se separaron trozos para cada uno de los siguientes análisis.

5.2.3.1) Determinación de Índices de caracterización

Los primeros análisis hechos a las ceras fueron los índices de caracterización, los cuales consisten en índice de saponificación, índice de acidez e índice de esterificación. A continuación, se detalla el paso a paso a seguir para el análisis de cada uno de los índices mencionados anteriormente.

Índice de Saponificación

1. Pesar 2 g de cera
2. Transferir muestra de cera a un matraz Erlenmeyer de 250 [ml]
3. Adicionar al matraz 25 ml de KOH 0,5M utilizando una pipeta aforada
4. Mediante baño maría dejar ebullición la solución, agitando frecuentemente
5. Mantener el calor 60 min
6. Retirar del calor y agregar 4 gotas de fenoftaleína al 1% como indicador
7. Titular la solución caliente con HCl 0,5 M hasta conseguir el cambio de color
8. Repetir el procedimiento anterior, pero sin agregar la muestra de cera para el blanco

El proceso descrito se mantuvo, según lo descrito en la memoria de macarena Quilodrán 2022 con el fin de que los resultados sean comparables, sin embargo, es importante remarcar que al agregar el HCl se debe agitar y calentar a medida que se agrega el HCL para evitar la solidificación de la cera de abeja.



Figura 15 Índice de saponificación(titulación)



Figura 14 índice de saponificación (cambio de color)

Índice de acidez

1. Se prepara una mezcla disolvente en un matraz Erlenmeyer de 250[ml], compuesta de 25 [ml] de etanol y éter etílico en proporción 1:1 v/v, junto con 1 [ml] de fenolftaleína al 1% p/v disuelta en metanol.
2. Neutralizar mezcla disolvente mediante una neutralización con KOH 0,1 [M]
3. Pesar 5 g de cera y adicionarla al matraz con la solución disolvente

4. Agregar 4 gotas de fenolftaleína y titular con KOH 0,5 [M] hasta conseguir un cambio de color
5. Repetir procedimiento anterior, pero sin agregar la cera de abeja, la cual se usará como muestra blanca

Se recomienda el uso de dos buretas, una con KOH 0,1 [M] y otra con KOH 0,5 [M] para la titulación debido a la rápida evaporación de los reactivos, por lo cual no debe pasar mucho tiempo entre titulaciones.



Figura 17 índice de acidez

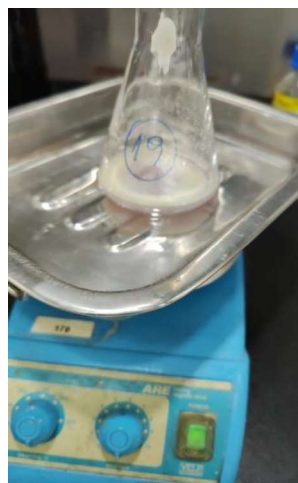


Figura 16 Índice acidez
cambio de color

5.2.3.2) Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja estudia los fenómenos de interacción entre la radiación de origen infrarrojo y la materia (Cortez, 2017). Es decir, provee información molecular de una muestra por efecto de su interacción con un haz de luz en la longitud d de onda infrarrojo (Pedro Mondragón Cortez, 2011).

Para este análisis se enviaron 2 [g] de cera de abeja de las muestras M1, M2, M3 y M4 fueron enviadas a la Unidad Central de Instrumentación de la Pontificia Universidad Católica de Chile con el fin de que fueran analizadas en mediante FTIR modelo IRTracer 100. Una vez analizadas nuestro análisis consiste en la comparación de los gráficos de espectroscopia observados en la muestra blanco en comparación los muestras M1, M2 y M3 y observar cómo ha cambiado el grafico de la cera de abeja con los distintos solventes.

5.2.3.3) Temperatura de Fusión:

La obtención del punto de fusión es importante ya que la cera de abeja funde entre 61- 65 [°C] además, por lo dicho anteriormente la temperatura del panal de abeja es aproximadamente de 35[°C](Planet bee Foundation, 2024) por lo tanto un bajo punto de fusión podría generar problemas en el panal,

El objetivo de esta prueba fue determinar el punto de fusión de nuestras muestras M1, M2, M3 y M4, y analizar cómo su punto de ebullición cambia producto de las soluciones limpiantes utilizadas. Para ello, se utilizó el equipo Melting Point Apparatus SMP3 además capilares en los que se colocó cera de abeja a analizar, realizando triplicados para cada una, lo que resultó en un total de 12 capilares. Cada muestra se le midió el punto de fusión, configurando el equipo inicialmente a 40 [°C] y con un incremento de 2 [°C] por muestra.



Figura 18 Melting Point Apparatus SMP3

5.2.3.4) Análisis espectroscopia de fuerzas

Este análisis se realizó a modo de prospección y como una mirada a futuros experimentos que puedan surgir dentro del Bee Lab.

La cera debe ser lo suficientemente flexible para que las abejas puedan darle forma. Por esta razón, se analizó el esfuerzo de cada una de las muestras M1, M2 y M3, y se comparó con el esfuerzo de la cera M4, con el objetivo de observar los cambios en la flexibilidad de la cera. Para llevar a cabo este análisis, se crearon pequeñas láminas de ceras que fueron llevados al departamento de física de la Universidad Federico Santa María.

5.2.3.5) Optimización de parámetros químicos

A partir de las concentraciones analíticas de los estándares, se diluyen las concentraciones iniciales para generar diluciones a concentraciones más bajas, estas concentraciones se inyectan en el UHPLC-MS/MS, donde se registran los tiempos de retención de cada analito (Imidacoprid, Fluvalinato, Amitraz, Coumaphos), posteriormente se analizan en el detector MS/MS, permitiendo la caracterización de los iones producto y el ion precursor en el espectrograma. El objetivo de este procedimiento es determinar cualitativa y cuantitativamente las señales de los pesticidas de interés, para poder determinar la presencia de estos compuestos mediante la comparación de los tiempos de retención y los iones producto obtenidos en ambos espectrogramas.

5.2.3.6) Procedimiento Curvas de Calibrado

1. Preparación de soluciones madres a partir de estándares comerciales de Imidacloprid, Amitraz, tau- Fluvalinato, Coumaphos,
2. Preparación de curva de calibrado.
3. Preparar una solución Mix que contiene Imidacloprid, Amitraz, tau- Fluvalinato, Coumaphos a partir de una solución madre de 1000 [ppb].
4. Por cada uno de los pesticidas generar puntos de concentración.
5. Proceder a inyectar soluciones de agroquímicos diluidas en UHPLC- MS/MS y caracterizar sus tiempos de retención, iones precursores y productos para obtener comparativa con muestras.

Tabla 3 Curva de calibración

concentración inicial [ppm]	concentración final [ppm]	volumen tomado [ml](volumen inicial)	volumen matraz [ml](volumen final)
1000	100	0,5	5
100	10	0,5	5
10	1,6	0,8	5
1,6	0,8	0,5	1
1,6	0,4	0,25	1
1,6	0,2	0,125	1
0,2	0,1	0,625	10
0,1	0,05	0,5	1
0,1	0,032	1,6	5
0,1	0,016	0,8	5
0,1	0,008	2,5	5
0,1	0,004	1,25	5
0,1	0,002	0,625	5
0,1	0,001	0,05	5

5.2.3.5) MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR QuEChERS

El método de QuEChERS utilizado se basó en el trabajo de Silvina Niell, sin embargo, se realizaron algunas modificaciones debido a las diferencias en la cantidad de cera de abeja utilizada y también a la diferencia de fase móvil utilizada (Niell et al., 2014b).

1. Pesar 1 [g] de cera de abeja y poner un en un tubo centrífugo de 50 [ml]
2. Añadir 5 [ml] de acetonitrilo
3. Cerrar el tubo y poner en baño de agua a 80 [°C] (hasta que la miel este derretida)
4. Posteriormente agitar el tubo vigorosamente durante 15 segundos y poner devuelta en baño de agua a 80[°C] se debe repetir 4 veces el proceso
5. Poner el tubo a refrigerar por al menos 12 horas para precipitar la cera en la solución
6. Transferir una alícuota del extracto a un tubo de centrifugación de un solo uso que contiene 25 [mg] de PSA y 25 [mg] de C18
7. Agitar el tubo durante 30 segundos y luego poner en centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos.
8. Transferir el extracto a un vial de tapón y rosca a través de filtro de jeringa Nylon de 2.0 [µm].
9. Agregar una solución de ácido fórmico al 5% en acetonitrilo (v/v) 10 microlitros/ [ml] de extracto

Es importante dejar las muestras refrigerando por un aproximado de 12 horas para que precipite el sobrenadante.

6.RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se procede a mostrar los resultados obtenidos para los experimentos realizados los cuales son los distintos Análisis Físico/químicos y purificación de las ceras.

6.1) Curva de calibrado

Lo primero fue encontrar los parámetros de identificación para cada pesticida los cuales son, tiempo de retención, ion precursor, ion producto y energía de colisión.

En la tabla siguiente se muestran los parámetros antes mencionados.

Tabla 4 parámetros de pesticida en UHPLC

Pesticida	Formula química	Peso Molecular [uma]	Tiempo de retención [min]	Ion precursor [uma]	Ion producto [uma]	Energía de colisión [V]
Imidacoprid	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	255,66	1,65	256,07	175,1	20
					209,03	
Coumaphos	$C_{14}H_{16}ClO_5PS$	362,77	7,98	363,01	226,98	20
					306,93	
Amitraz	$C_{19}H_{23}N_3$	293,41	10,163	294,2	163,19	20
					122,04	
Tau-Fluvalinato	$C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$	502,92	10,817	503,12	181,04	20
					256,25	

Para un correcto análisis en el UHPLC- MS/MS es necesario obtener una curva de calibrado, la cual se obtuvo con los siguientes parámetros.

Tabla 5 Parámetros curva baja de calibrado Imidacoprid

Concentración [ppb]	Area [counts*min]	Ec. De la recta
1	249,21	$Y=140.46x + 117,09$
2	336,48	
4	646,31	
8	1243,58	R^2
16	2432,84	0,9993
32	4703,83	
50	7031,09	

Tabla 6 Parámetros curva alta de calibrado Imidacoprid

Concentración [ppb]	Area [counts*min]	Ec. De la recta
100	12745,16	Y=91,997x+9803,1
200	25421,91	
400	53722,00	
800	89320,00	R ²
1600	152997,57	0,9898

Tabla 7 Parámetros curva baja de calibrado Coumaphos

Concentración [ppb]	Area [counts*min]	Ec. De la recta
1	292,59	y=231,7x+152,7
2	551,04	
4	1041,27	
8	2013,78	R ²
16	3975,30	0,9989
32	7853,22	
50	11524,31	

Tabla 8 Parámetros curva alta de calibrado Coumaphos

Curva de calibrado alta		
Concentración [ppb]	Area [counts*min]	Ec. De la recta
100	22211,66	y=234,66+4512
200	46993,90	
400	108353,67	
800	195866,79	R ²
1600	376570,15	0,9978

Tabla 9 Parámetros curva baja de calibrado Tau-fluvalinato

Concentración [ppb]	Area [counts*min]	Ec. De la recta
1	21,78	y=8,7866x+15,927
2	30,76	
4	48,50	
8	89,02	R ²
16	159,61	0,9988
32	306,60	
50	448,11	

Tabla 10 Parámetros curva alta de calibrado Tau-fluvalinato

Concentración [ppb]	Area [counts*min]	Ec. De la recta
100	877,31	y=9,5559x+43,094
200	1901,39	
400	4208,44	
800	7493,50	R ²
1600	15358,19	0,9987

A partir de esto, se procedió a analizar en el UHPLC-MS/MS la concentración de pesticida presente en cada una de las ceras después de realizar la limpieza.

Finalmente se establecieron Limite de detección y Limite de Cuantificación del equipo, para ello se realizaron varias etapas donde a través del equipo fluyo solo la fase móvil (muestra blanca), y se estableciendo la Limite de detección como el resultado detectado por el equipo solo con la fase móvil y se estableció como Limite de Cuantificación 3 veces el límite de detección.

$$\text{Limite de detección} = 3 * \text{Señal/ruido}(\text{Oscar Delgado}, 2023)$$

$$\text{Limite de Cuantificación} = 3 * \text{Limite de detección}(\text{Oscar Delgado}, 2023)$$

Tabla 11 Determinación de límite de detección y límite de cuantificación

	Límite de detección [ppb]	Límite de cuantificación [ppb]
Imidacoprid	0,1	0,3
Coumaphos	0,2	0,6
Tau-Fluvalinato	0,3	0,9

6.2) Purificación de ceras

La purificación de las ceras se llevó a cabo en el departamento de Química de la universidad Federico Santa María, para ello primero se necesitó realizar correctamente una curva de calibrado, la cual fue mencionada anteriormente y una vez realizado la curva se procedió a realizar una extracción mediante QuEChERS.

Tabla 12 Resultado % remoción de pesticidas

	Imidacoprid %	Fluvalinato %	Coumaphos %
M1(etanol)	95	4	11
M2(isopropanol)	96	28	38
M3(butanol)	89	3	44

Como se puede observar en los resultados, el imidacloprid presenta un alto porcentaje de remoción, seguido por coumaphos en segundo lugar y fluvalinato en tercer lugar. Por otra parte, el análisis químico no pudo ser optimizado para Amitraz, debido a ser un compuesto fotosensible y foto lábil. Su ausencia podría deberse a la descomposición del Amitraz en sus metabolitos, principalmente. Estudios sugieren que el Amitraz se degrada rápidamente en sus metabolitos, los cuales son principalmente N-(2,4-Dimethylphenyl) formamide y (2,4-DMF) and 2,4-Dimethylaniline (2,4-DMA)(Ramesh C. Gupta, 2014).

Para intentar comprender mejor como se relaciona el porcentaje de remoción de cada pesticida con los compuestos utilizados, en el ANEXO 1, Tabla 19, se adjunta una tabla con la solubilidad en agua de cada compuesto y su coeficiente de partición. El coeficiente de reparto octanol-agua (Kow), también conocido como coeficiente de partición (Pow), mide la solubilidad de una sustancia en agua en comparación con su disolución en n-octanol (un tipo de alcohol). Esta información nos ayudará a entender cómo la mezcla agua-compuesto utilizada en los métodos se relaciona con el porcentaje de remoción de cada pesticida. Como se puede observar, el Pow es inversamente proporcional al porcentaje de remoción obtenido con el método, lo que nos permite comprender mejor los resultados.

Otra manera de intentar comprender mejor lo sucedido, es comparar nuestros resultados S

Tabla 13 Comparación porcentajes de remoción con investigaciones previas

Pesticidas	Métodos Propuestos			(Macarena Quilodrán ,2023) *	(Ramos ,2022) **	(Luna et al ,2021) ***.
Limpieza	M1	M2	M3	-	-	-
Imidacoprid	95%	96%	89%	86%	97%	-
Fluvalinato	4%	28%	3%	-	27%	58,86%
Coumaphos	11%	38%	44%	40%	46%	82,76%
Propiconazole	-	-	-	17%	-	43,47%
Amitraz	-	-	-	81%	79%	-
Acrinatrina	-	-	-	1%	-	75,12%
Boscalid	-	-	-	76%	3%	-

*Solvente Metanol al 75% v/v,300 [g] cera de abeja, 500 RPM, a 65[°C] por 10 min.

** Solvente Agua-Ac. oxálico 0.25%, 300[g] cera de abeja, 500RPM, a 65[°C] por 10 min.

*** Solvente Metanol puro, 1[kg] cera de abeja, 200 RPM, a 65[°C] por 15 min.

Los porcentajes de remoción de imidacloprid logrados con los métodos propuestos superan a los reportados por Quilodrán (2023), aunque son menores que los obtenidos por Ramos (2022). En el caso del coumaphos, el método M3 mostró el mayor porcentaje de remoción, superior a los resultados de Quilodrán (2023), pero inferior a los de Ramos (2022). Para el fluvalinato, el método M2 logró un porcentaje de remoción superior al de Ramos (2022). Sin embargo, los porcentajes de remoción obtenidos para coumaphos y fluvalinato fueron significativamente menores que los reportados por Luna et al. (2021), quienes emplearon una solución de metanol puro.

El método de Luna et al. (2021), aunque eficaz en la remoción de pesticidas, presenta riesgos importantes debido al uso de metanol, un líquido altamente tóxico e inflamable (Karl Fischer Roti et al., 2024). El metanol puede ser letal si se inhala o entra en contacto con la piel y

requiere estrictas medidas de seguridad, incluyendo equipos de protección personal y sistemas de ventilación adecuados.

Por otro lado, solventes como etanol, isopropanol y butanol presentan una menor toxicidad en comparación con el metanol, aunque también deben ser manipulados con precaución. Estos solventes pueden causar irritación en las vías respiratorias y toxicidad si se ingieren (Carl Roth, 2024; Karl Fischer Roti et al., 2024; Roth GmbH, n.d.). Su mayor punto de ebullición los hace más fáciles de manejar en laboratorios y sistemas abiertos, reduciendo algunos riesgos asociados.

Aunque aún falta evaluar la aceptación de la cera purificada por las abejas en el panal, se sugiere el método M2 como una alternativa con buenos porcentajes de remoción y menores riesgos para la seguridad en comparación con el uso de metanol puro.

6.3) Análisis físico/ químico

8.3.1) índices de caracterización

En los análisis de los tres indicadores saponificación, acidez y esterificación se comparó los resultados de la cera control con los resultados de las ceras M1 M2 y M3 cada muestra realizada por triplicado.

6.3.1.1) Índice de saponificación

En la siguiente tabla se muestran los volúmenes consumidos de HCl por cada muestra, con ello se procedió a calcular el índice de saponificación con la siguiente formula:

Ecuación 1 Índice de Saponificación

$$\text{Índice de Saponificación: } \frac{(V_{\text{blanco}} - V_{\text{HCL}}) * N}{P} * 56.1 (\text{Manrique, 2022})$$

Donde:

V_{blanco} : Volumen de HCl consumido en titulación del blanco (sin muestra de cera)

V_{HCl} : Volumen de HCl consumido en titulación de la muestra (con muestra de cera)

N: es la normalidad de la solución

P: Peso de la muestra en gramos

Tabla 14 Resultados Índice de Saponificación

	M1.1	M1.2	M1.3	M2.1	M2.2	M2.3	M3.1	M3.2	M3.3	control 1	control 2	control 3
peso muestra[g]	2,04	1,98	1,99	1,93	2,12	1,99	1,93	1,99	1,94	2,05	2,00	2,01
HCl [ml]	18,30	18,70	18,00	19,00	19,50	18,20	20,00	19,00	19,00	15,00	15,50	15,30
HCL [L]	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
indice de saponificacion	50,91	46,76	56,40	43,71	33,11	53,49	29,09	42,38	43,42	95,78	91,16	93,50

6.3.1.2) Índice de acidez

Al igual que el caso anterior se procedió a registrar los volúmenes de KOH 0,1 M y KOH 0,5 M usado en la titulación de las soluciones. En este caso La fórmula usada para el cálculo del índice de acidez es la siguiente:

$$IA = \frac{M_{KOH} * V_{KOH} * PM_{KOH}}{Masa\ Cera} \text{ (Manrique, 2022)}$$

Tabla 15 Resultados índice de acidez resultados

	M1.1	M1.2	M1.3	M2.1	M2.2	M2.3	M3.1	M3.2	M3.3	control 1	control 2	control 3
peso muestra(g)	5,0	5,0	4,9	4,8	4,8	4,8	4,8	4,7	4,8	5,1	5,1	5,1
KOH 0,5 M	3,2	3,1	3,3	2,9	3,2	3,1	2,0	2,2	2,5	3,2	3,3	3,5
KOH 0,1 M	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
indice de sacidéz	17,9	17,5	18,9	16,8	18,6	18,0	11,7	13,0	14,7	17,7	18,3	19,2

6.3.1.3) Índice de esterificación

Finalmente, la variación de los parámetros de caracterización con respecto a la cera control son los siguientes:

Tabla 16 Resultados índice de esterificación

	Indice saponificacion (n=3)	indice acidez (n=3)	indice de ester (n=3)
M1	50,33±3,95	17,76±0,56	32,56±3,40
M2	41,81±8,32	17,13±0,74	24,67±8,59
M3	36,38±7,99	13,21±1,20	24,65±5,52
control	93,48±1,88	18,39±0,61	75,08±2,22

50,33 (M1), 41,81 (M2) y 36,38 (M3); para el índice de acidez, 17,76 (M1), 17,13 (M2) y 13,21 (M3); y para el índice de esterificación, 32,56 (M1), 24,67 (M2) y 24,65 (M3). Según los valores de referencia (European Pharmacopoeia, 2008), los índices de saponificación (87-102), acidez (12-22) y esterificación (70-80), el índice de acidez se encuentra dentro del valor de referencia, los índices de saponificación y esterificación obtenidos en este estudio se encuentran fuera del rango de referencia.

Una de las razones por las cuales se observaron variaciones en los índices y los valores obtenidos se encontraban fuera de los rangos esperados podría ser la dificultad de trabajar con muestras sólidas. Dado que la cera permanece en estado sólido a temperaturas inferiores a los 62[°C] aproximadamente, fue necesario calentar las muestras para fundirlas y aumentar el área de contacto entre los reactivos y la cera. Sin embargo, los compuestos

líquidos utilizados se encontraban a temperatura ambiente o incluso a temperaturas más bajas, lo que provocaba que la cera se solidificara casi instantáneamente al entrar en contacto con ellos, debido a la transferencia de calor impulsada por la diferencia de temperatura. Esto generó problemas, como la solidificación de la cera en las paredes del recipiente y un contacto insuficiente entre la cera y las soluciones, lo que alteró los resultados obtenidos.

6.3.2) espectroscopía de fuerzas

Este análisis se hizo a modo de introspección. Con ayuda del equipo Nanosurf FlexAFM se realizó la espectroscopia de fuerzas. La cual analiza el comportamiento de la cera ante la mecánica de una fuerza de torsión o estiramiento (Franco, 2008)

Según lo visto el módulo de Young mide la capacidad de un material para soportar cambios de longitud cuando están bajo tensión (Franco, 2008), esto es crucial para que la cera de abeja pueda ser moldeada en los nidos de las abejas sin que pierda su estabilidad. Un módulo de Young aceptable en la cera de abeja es de 300- 90 [Mpa] a 15 [°C] (Morgan et al., 2002)

Los resultados entregados se adjuntan en la siguiente tabla:

Tabla 17 espectroscopia de fuerzas

Ceras de abeja	Modulo de young [Mpa]
Control	90
M1	170
M2	97
M3	40

De acuerdo con los datos de la tabla, las muestras M1 y M2 están dentro del rango aceptable de elasticidad para la cera de abeja. Sin embargo, la muestra M3 presenta una elasticidad inferior a lo esperado. Esto podría generar problemas futuros para las abejas, ya que la falta de elasticidad necesaria podría afectar la estabilidad y funcionalidad de la cera en la colmena.

6.2.3) Temperatura de Fusión

Esta prueba consistió en determinar el punto de fusión de las muestras purificadas y compararlo con el de la muestra patrón, con el fin de verificar si el proceso de limpieza afectó esta propiedad de la cera de abeja. El equipo fue configurado con una temperatura inicial de 45 [°C] y un incremento de 2 [°C] por minuto. A través de una inspección visual, se identificó el punto en el cual la cera comenzaba a cambiar de estado. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 18 Resultados temperatura de fusión

Muestra	Temperatura [°C] (n=3)
M1	62 ,33
M2	61,33 ± 0,5
M3	63,33 ± 0,5
Control	63,33 ± 1

Como se puede observar, no se presentan diferencias significativas en el punto de fusión de las muestras purificadas en comparación con la muestra patrón. Aunque existe una leve variación que podría atribuirse a un posible error de medición, todos los valores obtenidos



Figura 19 Capilares de cera

se encuentran dentro del rango de punto de fusión para la cera de abeja comercial (61-65 °C (Roth GmbH, 2022)). Estos resultados son satisfactorios, ya que indican que la cera mantendrá su estado sólido dentro de la colmena.

6.3.4) espectroscopía Infrarroja

En esta sección, se analizó el comportamiento de los espectros de espectroscopia IR de las muestras patrón, M1, M2 y M3 para evaluar su similitud. Este análisis es esencial, ya que un método de purificación eficaz no solo debe eliminar los pesticidas, sino también asegurar que no se altere la composición química de la muestra, evitando la ruptura de enlaces o la formación de compuestos no deseados.

- 8.2.4.1) Cera control

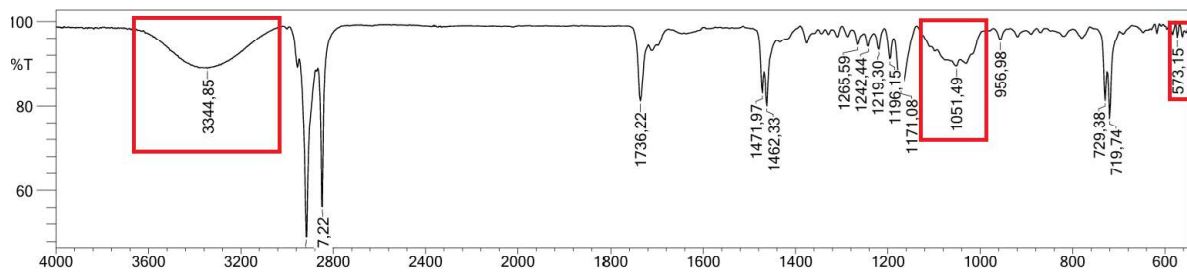


Figura 20 Espectroscopia infrarroja Cera patrón

- 8.2.4.2) Cera M1

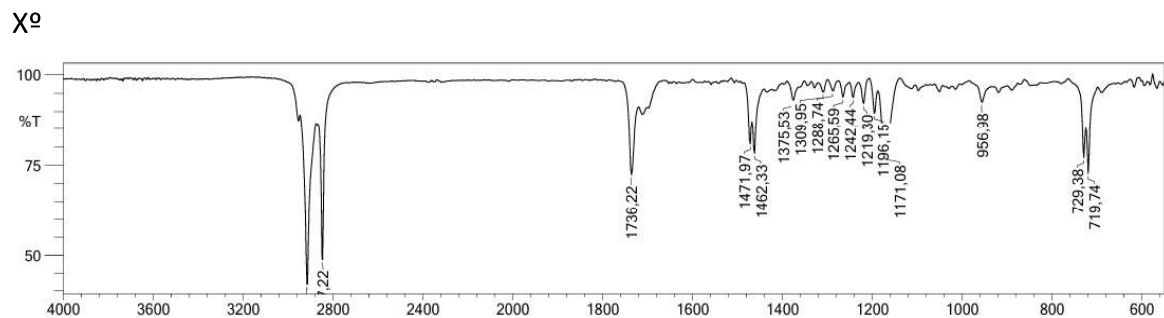


Figura 21 espectroscopia infrarroja Cera M1

S

sSS

- 8.2.4.3) Cera M2

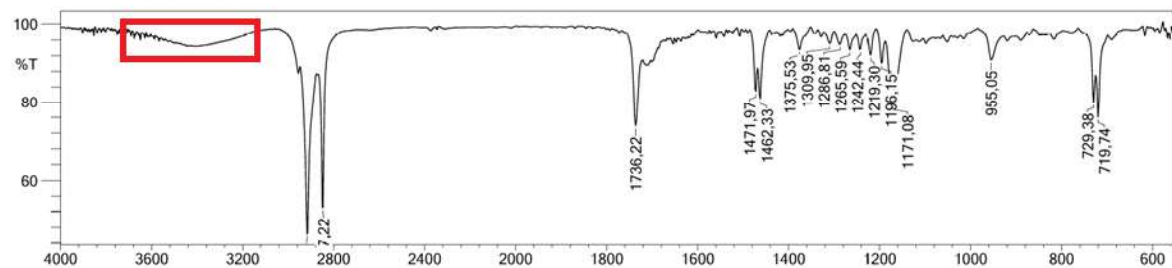


Figura 22 Espectroscopia infrarroja Cera M2

- 8.2.4.4) Cera M3

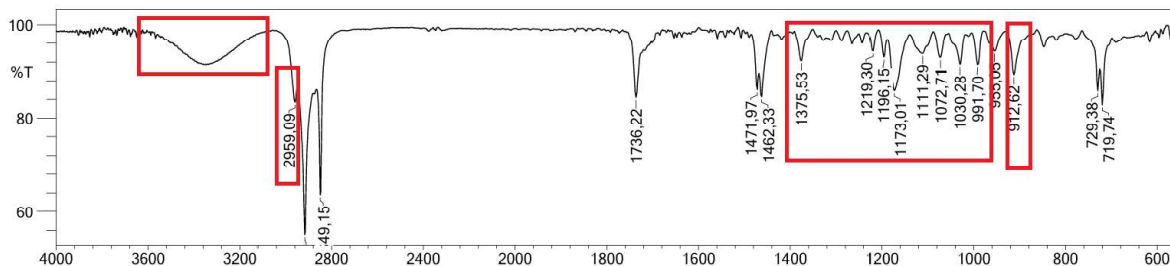


Figura 23 Espectroscopia infrarroja Cera M3

En el análisis, se identificaron valores espectrales asociados con grupos funcionales específicos de la cera de abeja, descritos a continuación:

- 2966 cm^{-1} (Stretching vibration CH_2): Representa hidrocarburos presentes en la cera.
- 2848 cm^{-1} (Hidrocarburos): Asociado con ácidos grasos libres.
- 1736 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$): Indica la presencia de grupos carbonilo en ácidos grasos libres.
- 1462 cm^{-1} (C-H , deformación): Corresponde a la vibración de hidrocarburos.

Las señales mencionadas son consistentes con la composición química característica de la cera de abeja (Špaldoňová et al., 2021).

Aunque las muestras purificadas (M1 y M2) presentan ligeras variaciones en comparación con el patrón, estas diferencias son mínimas y probablemente relacionadas con el proceso de purificación. Sin embargo, la muestra M3 posee claras diferencias con las demás muestras.

Se ha resaltado en casillas rojas aquellas diferencias encontradas en cada patrón de cera. En ANEXO 2 Figura 12 se encuentra una figura con más señales características de la cera de abeja.

6.3.5) Análisis porcentaje de humedad

Como se mencionó anteriormente las muestras una vez purificadas fueron pesadas y cada una de las muestras poseía un peso mayor a los 300 [g] iniciales usadas. Es por ello que las muestras se dejaron secar durante una semana bajo campana.

Para calcular el porcentaje de humedad presente en las muestras, se tomaron tres muestras por triplicado de cada cera (M1, M2 y M3), las cuales fueron pesadas inicialmente y luego colocadas en una placa Petri y llevadas a una estufa. Posteriormente, se controló su peso cada hora para registrar la pérdida de líquido en las muestras.

Tabla 19 Resultados análisis % de humedad

Número de muestra	Muestra inicial	Primer secado	Segundo secado	Tercer secado	Cuarto secado	% de humedad promedio (n=3)
	Masa [g]	Masa [g]	Masa [g]	masa [g]	masa [g]	
M1.1	2,007	1,992	1,986	1,983	1,971	1,85 ± 0,048
M1.2	2,108	2,094	2,083	2,080	2,075	
M1.3	2,121	2,100	2,094	2,090	2,075	
M2.1	2,138	2,083	2,071	2,063	2,032	3,7±0,044
M2.2	2,032	1,983	1,976	1,970	1,949	
M2.3	2,032	1,990	1,980	1,973	1,927	
M3.1	2,084	2,030	2,019	2,012	1,964	5,55± 0,156
M3.2	2,467	2,404	2,393	2,389	2,345	
M3.3	2,260	2,198	2,187	2,182	2,126	

Como se puede observar las ceras de abejas analizadas aun poseen un porcentaje de humedad remanente. El porcentaje de humedad de una cera comercial es del 2% (European Pharmacopoeia, 2008) por lo tanto, se adecuaron los resultados a los análisis hechos, sin embargo, no genero gran impacto en los resultados.

Proponer a escala de laboratorio una nueva metodología de purificación de ceras con mayor eficiencia en la remoción de compuestos liposolubles(acaricidas) en base a una solución hidroalcohólica que permita ampliar la capacidad de purificación a compuestos químicos hidrosolubles y liposolubles remanentes en ceras.

8.CONCLUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar tres nuevos métodos de purificación de pesticidas en cera de abeja, con el propósito de identificar el más efectivo para la eliminación de contaminantes. Este proceso no solo busca beneficiar a las abejas al reducir su exposición a sustancias tóxicas, sino también apoyar a los apicultores en la producción de productos más puros y seguros.

En términos de eficiencia para la remoción de pesticidas, los mejores resultados se obtuvieron con el método M2, que mostró una mayor efectividad para eliminar imidacloprid y Fluvalinato en comparación con los métodos M3 y M1. Por otro lado, el método M3 resultó ser más eficaz para la eliminación de Coumaphos, sin embargo, no tan eficiente al momento de eliminar los otros pesticidas.

En las pruebas físico-químicas, se compararon los resultados de las muestras M1, M2 y M3 con los de la muestra control, contrastándolos además con datos estándar. En general, las ceras purificadas presentaron ligeras modificaciones en su calidad, siendo el índice de saponificación la variación más significativa. Este índice mostró diferencias notables en los tres métodos en comparación con la cera control, que permaneció dentro de los parámetros de una cera de abeja convencional, sugiriendo una posible afectación en la calidad. Estas

discrepancias podrían atribuirse a errores experimentales o a la interacción de las soluciones limpiadoras con la cera.

Actualmente, en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile se encuentra disponible una lista de plaguicidas permitidos, los cuales son importantes ya que se pueden encontrar con mayor facilidad en el exterior. Entre los compuestos analizados, el más relevante es el imidacloprid, dado que, al ser un neonicotinoide, genera mayores daños en las abejas. En cuanto al control de la varroa, los acaricidas permitidos en Chile para uso apícola son el Amitraz, el Timol y la Flumetrina, sin embargo, el Amitraz debido a su carácter termo y fotolabil, se descompone lo cual genera dificultad en su análisis.

En general, la mezcla agua-isopropanol 50:50 v/v (M2) se destacó como el mejor método de purificación por su balance entre eficiencia de remoción de pesticidas y preservación de la calidad de la cera.

9. REFERENCIAS

- Adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Bayarri, S., & Herrera, A. (2010). Impact of the use of fluvalinate on different types of beeswax from Spanish hives. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), 733–739. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9387-7>
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Seiler, K., Pfefferli, H., Frey, T., Roux, B., Wenk, P., & Noser, J. (2004). Residues of para-dichlorobenzene in honey and beeswax. *Journal of Apicultural Research*, 43(1), 14–16. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101102>

- Boi, M., Serra, G., Colombo, R., Lodesani, M., Massi, S., & Costa, C. (2016). A 10 year survey of acaricide residues in beeswax analysed in Italy. *Pest Management Science*, 72(7), 1366–1372. <https://doi.org/10.1002/ps.4161>
- Bonzini, S., Tremolada, P., Bernardinelli, I., Colombo, M., & Vighi, M. (2011). Predicting pesticide fate in the hive (part 1): Experimentally determined τ -Fluvalinate residues in bees, honey and wax. *Apidologie*, 42(3), 378–390. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0011-2>
- Bradbear, Nicola. (2005). *La apicultura y los medios de vida sostenibles*. FAO.
- Consortio de Desarrollo Tecnológico Apícola S.A. (2014). *ESTUDIO DE MERCADO INDUSTRIA APICOLA CHILENA*.
- Coro Arizmendi. (2009). *La crisis de los polinizadores*.
- Efrén, R., Romero, V., Rodrigo, •, Martínez, A., Nelly, S., Ortega Flórez, C., Dayam, W., & Quintero, M. (2012). *APICULTURA ABEJA (Apis mellifera) Autores*. www.produmedios.org
- Espectrometría de masas. (n.d.). *ESPECTROMETRIA DE MASAS*.
- Facultad de Farmacia de la universidad de Granada. (2016). *eug,VIII Congreso Nacional de Apicultura Granada España*.
- FAO. (2020). *Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas : adoptado por el 123º período de sesiones del Consejo de la FAO, noviembre de 2002*. FAO.
- Fernando Calatayud Tortosa; Enrique Simó Zaragoza. (2023). *RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN LA CERA Y EN EL POLEN*.
- Franco, M. A. (2008). *Nanoindentation based on force spectroscopy with an atomic force microscope*.
- Frison, S., Breitzkreitz, W., Currie, R., Nelson, D., & Sporns, P. (1999). *The analysis of τ -flavinate in beeswax using GC/MS*. www.elsevier.com/locate/foodres
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23(5), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>
- Jiménez, J. J., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., & Martín, M. T. (2005a). Residues of organic contaminants in beeswax. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(12), 896–902. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500284>

- Jiménez, J. J., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., & Martín, M. T. (2005b). Residues of organic contaminants in beeswax. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(12), 896–902. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500284>
- Lodesani, M., Costa, C., Serra, G., Colombo, R., & Sabatini, A. G. (2008). Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, 39(3), 324–333. <https://doi.org/10.1051/apido:2008012>
- Luna, A., Alonso, R., Cutillas, V. M., Ferrer, C. M., Gómez-Ramos, M. J., Hernando, D., Valverde, A., Flores, J. M., Fernández-Alba, A. R., & Fernández-Alba, A. R. (2021). Removal of pesticide residues from beeswax using a methanol extraction-based procedure: A pilot-scale study. *Environmental Technology and Innovation*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101606>
- Miranda, R., Pady, O., & Ocaña, M. (2015). *Prácticas de apicultura*.
- Morgan, J., Townley, S., Kemble, G., & Smith, R. (2002). Measurement of physical and mechanical properties of beeswax. *Materials Science and Technology*, 18(4), 463–467. <https://doi.org/10.1179/026708302225001714>
- Neira, M. C., Kauzlarich, C. R., Navarro, G. D., Dörner, K. C., & Manquían, N. T. (2011). RESIDUOS DE TAU FLUVALINATO (PIRETROIDE) EN LA CERA DE LA CÁMARA DE CRÍA Y SU EFECTO SOBRE LARVAS DE ABEJAS DE LA CASTA OBRERA (*Apis mellifera* L.) TAU FLUVALINATE RESIDUES (PYRETHROID) IN THE WAX OF THE BROOD CHAMBER AND ITS EFFECT ON LARVAE OF WORKER CASTE BEES (*Apis mellifera* L.). In *Agro Sur* (Vol. 39, Issue 1).
- Nick A. Romero. (2022). *Abejas en peligro de extinción - Causas, especies más amenazadas y SOLUCIONES*.
- Niell, S., Cesio, V., Hepperle, J., Doerk, D., Kirsch, L., Kolberg, D., Scherbaum, E., Anastassiades, M., & Heinzen, H. (2014a). QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3675–3683. <https://doi.org/10.1021/jf405771t>
- Niell, S., Cesio, V., Hepperle, J., Doerk, D., Kirsch, L., Kolberg, D., Scherbaum, E., Anastassiades, M., & Heinzen, H. (2014b). QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3675–3683. <https://doi.org/10.1021/jf405771t>

- ODEPA. (2015). *Ministerio de Agricultura “Informe Final Estudio Estratégico de la Cadena Apícola de Chile.”* www.odepa.gob.cl
- ODEPA. (2021). *Apicultura Chilena: principales cifras y desafíos futuros.* www.odepa.gob.cl
- ODEPA. (2023). *Art_TemporadaApicola2022_23 (1).*
- Omar Diaz, D. R. (2018). *Pesticides; classification, need of an integrated management and alternatives to reduce its undue consumption: a review.*
- Parra S. (2023). *Día Mundial de las Abejas: ¿Por qué están en peligro?*
- Patricia Vit. (2005). *productos de la colmena secretados por las abejas: Cera de abejas, jalea real y veneno de abejas.*
- Planet bee Foundation. (2024). *Bee Architecture_ How Apis Mellifera (Honey Bees) Build Their Hives.*
- Potts, S. G. ., Imperatriz-Fonseca, V. L., Ngo, H. T. ., Biesmeijer, J. C. ., Breeze, T. D. ., Dicks, L. V. ., Garibaldi, L. A. ., Hill, Rosemary., Settele, Josef., & Vanbergen, A. J. . (2016). *The assessment report on pollinators, pollination and food production: summary for policymakers.* Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services.
- Ramesh C. Gupta, D. M. (2014). *Biomarkers in Toxicology.*
- Rezić, I., Horvat, A. J. M., Babić, S., & Kaštelan-Macan, M. (2005). Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry*, 12(6), 477–481. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.07.004>
- Roth GmbH, C. (2022). *Cera de abejas Blanco.* www.carlroth.de
- Serra-Bonvehí, J., & Orantes-Bermejo, J. (2010). Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax. *Pest Management Science*, 66(11), 1230–1235. <https://doi.org/10.1002/ps.1999>
- Špaldoňová, A., Havelcová, M., Lapčák, L., Machovič, V., & Titěra, D. (2021). Analysis of beeswax adulteration with paraffin using GC/MS, FTIR-ATR and Raman spectroscopy. *Journal of Apicultural Research*, 60(1), 73–83. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1774152>
- Steinborn, A., Alder, L., Spitzke, M., Dörk, D., & Anastassiades, M. (2017). Development of a QuEChERS-Based Method for the Simultaneous Determination

of Acidic Pesticides, Their Esters, and Conjugates Following Alkaline Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(6), 1296–1305.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05407>

Ulibarry, P. G., Torres Muñoz, R., & Loiseau, V. (2020). *Efecto y regulación de los plaguicidas sobre las abejas* Autores. <http://bcn.cl/1z3bu>

Verine Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). DISCREPANCY BETWEEN ACUTE AND CHRONIC TOXICITY INDUCED BY IMIDACLOPRID AND ITS METABOLITES IN APIS MELLIFERA. In *Environmental Toxicology and Chemistry* (Vol. 20, Issue 11).

Wiest, L., Buleté, A., Giroud, B., Fratta, C., Amic, S., Lambert, O., Pouliquen, H., & Arnaudguilhem, C. (2011). Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(34), 5743–5756.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.079>

Yáñez, K. P., Bernal, J. L., Nozal, M. J., Martín, M. T., & Bernal, J. (2013). Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. *Journal of Chromatography A*, 1285, 110–117.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.032>

Zone, A. (2019). *The Bee: “The Most Important Living Being on the Planet.”*
www.globalresearch.ca

10.ANEXO

10.1) Anexo 2: Propiedades físico-químicas de pesticidas de estudio (solubilidad en agua, peso molecular y pow)

Tabla 20 Propiedades físico-químicas de pesticidas de estudio

Pesticidas	Peso molecular (Ilo,2022)	Solubilidad en agua (Ilo,2022)	Pow (Ilo,2022)
Imidacoprid	255,66	Alta solubilidad	0,57

Fluvalinato	502,91	insoluble	7,02
Coumaphos	362,77	insoluble	4,13

10.2) Anexo 2: Asignación de modos vibracionales de cera de abeja

6 A. Špaldoňová et al.

Table 1. Assignment of vibrational modes for the FTIR-ATR and Raman spectra of the beeswax and paraffin (Czamara et al., 2015; Edwards et al., 1996; Jones et al., 1952; Kitagawa et al., 1962; Socrates, 2004).

Band position in FTIR-ATR spectrum (cm ⁻¹)		Band position in Raman spectrum (cm ⁻¹)		Assignment
beeswax	paraffin	beeswax	paraffin	
2956	2958			$\nu^{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2916	2916	2881	2881	$\nu^{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2871	2872	2932	2932	$\nu^{\text{s}}(\text{CH}_3)$
2848	2848	2846	2847	$\nu^{\text{s}}(\text{CH}_2)$
1736		1735		$\nu(\text{C}=\text{O})$ esters
1724				$\nu(\text{C}=\text{O})$
				hydroxyl-esters
1711, 1697	1473, 1462, 1452			$\nu(\text{C}=\text{O})$ COOH
		1655		$\nu(\text{C}=\text{C})$ olefinic
1472, 1462		1462, 1440	1463, 1441	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$
1414, 1397		1419	1419	$\delta(\text{CH}_2)$ adjacent to the COOH
				$\delta(\text{CH}_3)$
1357, 1376	1377, 1368	1371	1370	$\delta(\text{CH}_2)$
1345, 1329, 1309, 1288, 1266, 1244, 1220, 1196		1296	1296	wagging + twisting, $\nu(\text{C}-\text{O})$ at COOH
1171				$\nu(\text{C}-\text{O})$ esters
		1172	1172	$\rho(\text{CH}_2)$
1125	1126, 1106, 1045, 1009			$\nu(\text{C}-\text{O})$ alcohols
1098, 1114		1131, 1099	1134, 1111	$\nu(\text{C}-\text{O})$ alcohols, esters $\nu(\text{C}-\text{C})$
1051		1063	1063	$\nu(\text{C}-\text{O})$
				alcohols $\nu(\text{C}-\text{C})$
1029, 1014				$\nu(\text{C}-\text{O})$ alcohols
956	959, 889			$\gamma(\text{OH})$ acids
916		920		
		891	891	$\rho(\text{CH}_3)$
730, 720	730, 719			$\gamma(\text{CH}_2)$
683				$\delta(\text{COO})$ acids
550				$\omega(\text{COO})$ acids

ν - stretching, δ - deformation, γ - out-of-plane, ρ - rocking, ω - wagging, as - asymmetric, s - symmetric.

Figura 24 Asignación de modos vibracionales de cera de abeja (Špaldoňová et al., 2021)